

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**PEDİATRİK HEMATOLOJİ-ONKOLOJİ KLİNİĞİ
HASTALARINDA İMMUNBLOT YÖNTEMİ İLE
EPSTEİN-BARR VİRÜS SEROLOJİSİ ARAŞTIRILMASI**

TUĞÇE YALÇIN AKGÜÇ

**DANIŞMAN
PROF. DR. ALİ AĞAÇFİDAN**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Programında Tuğçe Yalçın Akgüç tarafından hazırlanan Pediatrik Hemotoloji-Onkoloji Kliniği Hastalarında İmmunblot Yöntemi İle Epstein-Barr Virus Serolojisi Araştırılması başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

05 / 02 / 2015

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

İmzası

1.Prof.Dr Ali Ağaçfıdan (Danışman) İstanbul Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

2.Prof Dr Emel Bozkaya

Haliç Üniv.Fen Bil.Enst.Molk.Biyo.ve Genetik AD.

3.Prof Dr Yıldız Yeğenoğlu

İstanbul Tıp Fak. Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

4.

5.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Tuğçe YALÇIN AKGÜÇ

İTHAF

Aileme.....



TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında emek veren ve desteğini her zaman hissettiğim İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve danışmanım Prof. Dr. Ali Ağaçfıdan başta olmak üzere, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı tüm Öğretim Üyeleri'ne, Pediatrik Hematoloji-Onkoloji Kliniği A.D. hocalarından Prof. Dr. Ayşegül Ünüvar ve tüm ekibine, tezimin tüm aşamalarında bana destek olan Dr. Mustafa Önel'e, birlikte çalıştığım tüm biyolog arkadaşlarıma, beni yetiştiren ve sevgilerini esirgemeyen değerli aileme ve canım eşime teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 19386

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İ
BEYAN.....	İİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Vİİİ
ÖZET	İX
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
4. BULGULAR.....	23
5. TARTIŞMA	25
KAYNAKLAR	29
ETİK KURUL KARARI	35
ÖZGEÇMİŞ	36

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1	Virus yapısı
Şekil 2.6.2.1	Hüморal İmmünite
Şekil 4.1.1.1	Seronegatif İmmünblot çalışması
Şekil 3.5.1	Euroline Scan Cihazı Analiz Sonuç Tablo Örneği
Şekil 3.6.1	Analiz Sonuçlarındaki bantların değerlendirildiği tablo
Şekil 4.1	Seronegatif sonuçların gruplardaki dağılımı
Şekil 4.2	Akut enfeksiyon sonuçlarının gruplardaki dağılımı
Şekil 4.3	Geçirilmiş enfeksiyonun gruplardaki dağılımı
Şekil 4.4	Reaktivasyon sonuçlarının dağılımı

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- EBV:** Epstein-Barr Virus
- EM:** Enfeksiyöz mononükleosiz
- IB:** İmmünblot
- PCR:** Polimeraz zincir reaksiyonu
- EBNA:** Epstein-Barr Virus Nükleer antijen
- LMP:** Latent membran protein
- IEA:** Erken başlangıç antijeni
- EA:** Erken Antijen
- VCA:** Viral kapsit antijeni
- MA:** Membran Antijeni
- TP:** Terminal Protein
- NK:** Natural killer (doğal öldürücü)
- XLPS:** X'e bağlı lenfoproliferatif sendrom
- NPC:** Nazofaringeal karsinoma
- HL:** Hodgkin Lenfoma
- NHL:** Non- Hodgkin Lenfoma
- BOS:** Beyin omurilik sıvısı
- NAT:** Nükleik asit testleri
- PTLH:** Post transplant lenfoproliferatif hastalıklar
- ÜSYE:** Üst solunum yolu enfeksiyonu
- BL:** Burkitt Lenfoma

ÖZET

YALÇIN T. (2015). Pediatrik Hematoloji-Onkoloji Kliniği Hastalarında İmmunblot Yöntemi ile Epstein-Barr Virus Serolojisi Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul

Bu çalışmada EBV enfeksiyonlarının moleküler tanısında laboratuvarımızda rutin kullanılan, EBV DNA test sonuçlarının doğrulama testi olarak görülen immünblot testi ile serolojik profilin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarına Pediatrik Hematoloji-Onkoloji Kliniği'nden gönderilen EBV-DNA pozitif olarak saptanmış 50 hasta örneği, kontrol grubu olarak EBV-DNA negatif saptanmış 45 hasta örneği kullanılmıştır. Kitlerde bulunan IgM ve IgG sınıfından VCA gp125, VCA p19, EBNA-1, p22 ve EA-D antijenlerine karşı oluşan antikorların durumu araştırılmıştır. İmmünsüprese hasta grubunda % 84 geçirilmiş enfeksiyon, % 10 akut enfeksiyon, % 6 reaktivasyon, kontrol grubunda % 8.8 seronegatiflik, % 91.1 geçirilmiş enfeksiyon saptanmıştır. Buna göre; EBV enfeksiyonlarında reaktivasyonun saptanması için immünblot yönteminin tek başına yetersiz kalacağını, immünblot testinin immünsüprese hasta grubunda moleküler testlere alternatif değil yorumlanmasında yardımcı olarak kullanılabileceğini, maliyet açısından değerlendirildiğinde bu tip hastalarda immünblot yönteminin tek başına enfeksiyonu saptamada yetersiz olduğundan avantaj sağlamayacağını, moleküler yöntemlerle çalışılan hastalara ait olan plazma örneklerinin sayılarının artırılmasını ve klinik seyri takip edilerek irdelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Epstein-Barr Virus, İmmunblot, seroloji, Latent enfeksiyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 19386

ABSTRACT

YALÇIN T. (2015).Investigation of Epstein-Barr Virus Serology by Immunblot Method in Pediatric Hematology-Oncology Clinic Patients. Istanbul University Health Sciences Institute, Master's Thesis. İstanbul.

In this study, our aim was to evaluate the serological profile of EBV infection by using immunoblot (IB) test method, which is considered as a corfirmatory test of EBV-DNA test that is used in our laboratory routinely for molecular diagnosis. For this purpose, samples of 50 EBV-DNA positive patient as immunosuppressed group and 45 EBV-DNA negative patients, as a control group, were sent from the Pediatric Hematology-Oncology Clinic to Istanbul University Department of Medical Microbiology Laboratory. The behaviors of the IgM and IgG antibodies against VCAgp 125 ,VCA gp19, EBNA-1, p22, EA-D antigens were investigated. As a result, past infection 84%, acute infection 10%, reactivation 6% were detected in immunosuppressed patients. Seronegative 8.8%, past infection 91.1% were detected in immunosuppressed patients. According to this; solely IB method is insufficient in order to determine the reactivation of EBV infection. IB test method may be helpful in the interpretation of PCR results rather than being an alternative method, since IB method is not sufficient for detection of the infection in these patients, it does not provide advantageous interms of cost, amount of the plasma samples of patient that are studied by molecular methods should be increased and should be discussed by following their clinical status.

Key Words:Epstein-Barr Virus, Immunblot, Serology, Latent infection

This study was supported by Istanbul University Scientific Reserch Project Unit.Proje No:19386

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Epstein-Barr Virus (EBV), sınırlı sayıda konak çeşitliliği gösteren gammaherpesvirinae alt ailesinin bir üyesidir. Az gelişmiş ülkelerde 5 yaşın altındaki çocukların %80-90'ının, EBV ile enfekte olduğu saptanmıştır. EBV enfeksiyonlarının çoğu çocukluk döneminde asemptomatik olarak geçirilmektedir. En sık rastlanan hastalık tablosu; enfeksiyöz mononükleozdur (EM) (1).

EBV enfeksiyonlarında kemoterapi, radyoterapi uygulamaları ve nötropeni gibi klinik bulgular enfeksiyonlara duyarlılığı artırmaktadır. Akut, kronik, latent EBV enfeksiyonları bu uyarılarla reaktif olabilir.

EBV serolojisinin profilini belirlemede çeşitli ticari kitler geliştirilmiş, bu konuda İmmünblot (İB) testleri yüksek özgüllüğü nedeniyle doğrulama amaçlı kullanılmaya başlanmıştır. İB analizleri, spesifik EBV antijenine karşı oluşan EBV spesifik antikorların eş zamanlı olarak saptanmasında önemli bir yer tutmaktadır (2).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile IB yöntemi maliyet açısından değerlendirildiğinde, IB testinin maliyetinin PCR yöntemine göre daha düşük olması sebebiyle, rutin PCR testlerine alternatif olarak IB metodunun rutin tanıda kullanılabilirliğini ve güvenilirliğini test etmeyi amaçladık.

Ayrıca, çalışmamızda İstanbul Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji-Onkoloji Kliniği'nden gönderilen ve İstanbul Tıp Fakültesi Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalında EBV-DNA pozitif ve EBV-DNA negatif saptanmış çocuk hastalarda IB yöntemini kullanarak EBV'ye karşı oluşacak serolojik yanıtı araştırmayı ve EBV-DNA sonuçlarıyla karşılaştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

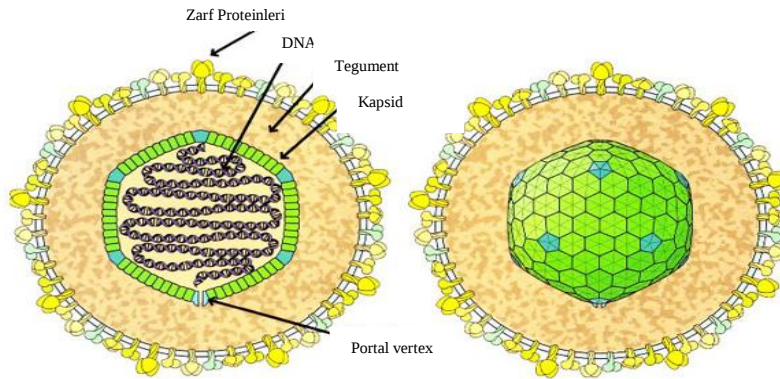
2.1 TARİHÇE

EBV, Herpesviridae ailesinin gammaherpesvirinae alt ailesinde çene kaynaklı bir tümörün tanımlanmasıyla fark edilmiştir. Burkitt lenfoma (BL) olarak adlandırılan tümörün B lenfosit kaynaklı olduğu anlaşılmıştır. 1964 yılında Epstein, Achong ve Barr tarafından tümörden elde edilen hücre dizilerinde virus partiküllerine rastlanmış, bu virusun Herpesvirus grubunun ayrı bir üyesi olduğu tanımlanmıştır. Daha sonraları EM'nin etiyolojik ajanının EBV olduğu belirlenmiştir. Seroepidemiolojik ve moleküler çalışmalar EBV'nin diğer lenfoid ve epiteliyal tümörlerle ilişkisini ortaya çıkarmıştır (2,3).

2.2 VİROLOJİ

2.2.1 FİZİKSEL ÖZELLİKLER

EBV Gammaherpesvirus grubunda olup Herpesvirusların karakteristik özelliklerini gösterir (4,5). Virusun Sezyum klorid içinde dansitesi 1.2-1.3 dür. Virus, 184 kb'lık çift sarmallı doğrusal DNA içermektedir. Nükleik asidi 162 kapsomerden oluşmuş ikozahedral yapıda kapsid çevreler. Virusun, enfekte hücrelerden tomurcuklanma aşamasında oluşan lipid içerikli bir zarfı vardır. Zarfta virusa ait glikoproteinler bulunmaktadır. Olgun viriyonun çapı 150-200 nm'dir (3). Bazı hücrelerde EBV-DNA konak hücrenin kromozomuna entegre durumda iken, viriyon lineer yapı görünümündedir. Virus latent olarak enfekte hücrede ekstrakromozomal sirküler yapı özelliği göstermektedir (6).



Şekil 2.1 Virus yapısı

2.2.2 EBV PROTEİNLERİ

Virusla ilgili yaklaşık 70 kadar protein kodlanmaktadır. Bu proteinlerin bir kısmının fonksiyonu henüz tam olarak tanımlanamamıştır (2).

2.2.2.1 Latent proteinler ve özellikleri

2.2.2.1.1 EBNA:

EBNA-1

Bu protein epizomal replikasyon ve enfeksiyonun devamı için gereklidir. Virusun genomundaki cis etkili eleman oriP ile etkileşerek yeterli DNA replikasyonunu sağlar. Mitoz ve genomun ayrılması sırasında DNA'yı kromozoma bağlar (3). Rekombinant viruslar içinde EBNA-1 proteinini sentezlemeyenler B lenfositlerini ölümsüzleştirememektedir (7).

EBNA-2

B lenfositlerinin transformasyonunda görev alan proteindir. B lenfositlerinin ölümsüzlüğünde önemli rol oynar. B lenfosit aktivasyon genlerinden CD21 ve aktivasyon belirteci olan CD23 ile onkojen genlerden c-myc ve c-fgr genlerinin ekspresyonunu artırır. Latent genlerden olan LMP-1 ve LMP-2'nin ekspresyonunda görev alır (3,8).

EBNA-3A,3B,3C

Bu proteinler, EBNA-2 tarafından aktive edilen genleri inhibe eder (3). EBNA-3 proteinleri EBNA-2 gibi RBP_Jk'ya bağlanabilir ve EBNA-2'nin bağlanmasını inhibe edebilirler (9). EBNA3C LMP promotörünü aktive eder. B lenfosit transformasyonunda EBNA3A ve EBNA3C gerekli iken EBNA3B bu konuda önem taşımamaktadır (9,10,11). EBNA3B, CD40 ve vimentin promotorlarını transaktive etmektedir (9).

EBNA-LP:

EBNA RNA'larının öncüsüdür. EBNA-2'nin hücre büyümesini arttırıcı etkisine yardımcı olur (3). B lenfositlerinin çoğalmalarında etkilidir (12). p53 ve pRb ile ilişkili görülmüş ancak kanıtlanmamıştır (13).

2.2.2.1.2 LMP:

LMP-1, EBNA-2 tarafından indüklenir ve plazma membranında yer alır. B lenfositlerinin ölümsüzlüğü ve proliferasyonu için gerekli bir proteindir. CD23 ve CD40 adezyon moleküllerinin artışına sebep olarak B lenfosit aktivasyonu ve DNA sentezini indükler. Bu şekildeki B lenfosit aktivasyonu, tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör olan (traf)-sinyal molekülleri ve transkripsiyon faktörü NF-κB tarafından kontrol edilir. B lenfositleri bcl-2'yi indükleyerek apoptozisden korunur (3).

LMP-2A, LMP-2B (terminal proteinler 1 ve 2) genomun TR bölgesinden kodlandığından sadece dairesel viral genomdan translasyonu gerçekleşmektedir. Hücre membranı ile ilişkilidirler. LMP-2A'nın amino ucu protein tirozin kinazlarla etkileşir, enfekte B lenfositlerinin aktivasyonunu inhibe eder, litik viral replikasyonu inhibe ederek hücre yaşamının devamını ve virusun latent olarak kalmasını sağlar (3).

2.2.2.2 Litik proteinler ve özellikleri

2.2.2.2.1 IEA(Erken başlangıç antijeni):

BZLF1(Z) ve BRLF1(R) erken genlerin transkripsiyonunu başlatır (3). Transkripsiyon aktivatörleridir (14,15).

2.2.2.2.2 EA (Erken antijen) :

30 civarında erken gen bulunmaktadır. Çoğunun viral DNA replikasyonu için gerekli enzim fonksiyonu mevcuttur.

D (yaygın): Enfekte hücrenin nükleus ve sitoplazmasında yaygın olarak bulunmaktadır

R (kısıtlı): Sadece nükleusta bulunur (1).

2.2.2.2.3 VCA (Viral kapsit antijen):

Geç oluşan bir antijendir. Virus üreten hücrelerde görülür (1,3). Litik enfeksiyonun geç döneminde sentezlenir; yapısal bir proteindir (16).

2.2.2.3 Glikoproteinler

Gp340/220 : Zarf glikoproteinidir. Virusun konak hücre yüzeyindeki EBV reseptörü olan CR2 (=CD21) molekülüne tutunmasını sağlar. Gp340/220 moleküllerine

karşı oluşan antikorlar hücrenin enfeksiyonunu engelleyebileceğinden bu molekülün aşı çalışmalarında öncülük edebileceği kabul edilmektedir.

Gp85: HSV'nin gH glikoproteinine benzerlik gösterir. Viral ve hücrel membranlar arasındaki birleşmeyi başlatıcı etkisi vardır.

Gp25: Gp85 molekülünün hücre yüzeyine taşınmasını sağlar. Viral-hücrel membranların füzyonu sağlanır.

Gp42: B lenfosit yüzeyindeki HLA II moleküllerine bağlanarak virusun hücre içine geçişini sağlar (3).

2.3 LİTİK DÖNGÜ

Virusun genomundaki Z gen bölgesinden kodlanan ZEBRA peptid sentezlenir. Zebra, virusun transkripsiyonunu aktive eden bir proteindir ve en erken genleri aktive ederek litik enfeksiyonu başlatır. Erken antijenler viral DNA sentezine neden olmaktadır. Viral DNA, viral VCA ve LMP oluşumunu düzenlemektedir. Litik döngüde B lenfositlerinin EBV ile enfeksiyonu hücre ölümüyle sonlanır (1.3). Litik enfeksiyon proteinleri; İEA, EA, VCA, MA'dır (1).

2.4 LATENT DÖNGÜ

Transforme olarak adlandırılan, sınırsız replikasyona izin veren enfekte B lenfositleri hücre DNA'sına entegre olmuş viral DNA kopyaları bulundurur. Bu dönemde oluşturulan viral proteinler; EBNA1,2,3, LMP-1 ve TP-2 veya LMP-2 (terminal protein)'dir. Latent enfeksiyon daha yaygın görülen şeklidir. Transforme hücrelerin bir bölümü T lenfositleri tarafından parçalanır. Bir bölümü kendiliğinden litik döngüye geçiş yaparken, bir bölümü yaşam boyu kendini muhafaza eder. Parçalanmış B lenfositlerindeki antijenler antikor yanıtını oluşturur (17).

Konak B lenfositlerinin antikorlarıyla karşılaşan latent EBV, uyarılarak EBV-BZLF-1=zebra proteinini aktive eder. Bu proteinin aktifleşmesiyle hücre litik döngüye girerek lizis ile sonuçlanacak olan yeni viriyon üretimi başlar. Latent virus hücrenin litik döngüye girmesi ise reaktivasyon şeklinde sonuçlanmaktadır (3,5).

2.5 PATOGENEZ

Seropozitif kişilerde EBV'nin oral atılımı süreklilik göstermektedir. Bulaş en sık yakın temas ile olmakla (öpüşme ve sekresyonların bulaştığı gıdaların yenmesi gibi) birlikte kan transfüzyonu ve organ nakli ile de bulaş söz konusudur (3).

EBV öncelikle orofaringeal epitel hücrelerinde prodüktif bir enfeksiyona sebep olur. İnsanların B lenfositlerinin yüzeyinde ve nazofaringeal epitel hücrelerinde EBV reseptörleri bulunur. B lenfositlerinde bulunan CD3d kompleman (CR2 veya CD21) reseptörleri EBV reseptör fonksiyonuna sahiptir. EBV gp350 yüzey proteini ile CD21 reseptörü olan B lenfositleri ve benzeri hücrelere tutunarak girerler. Enfekte B lenfositlerinde 30-50 gün inkübasyon döneminin ardından viral replikasyon başlar. Virus B lenfositlerinde çoğalarak hücreleri yıkıma uğratar ve salınan virüsler retikuloendotelial sisteme girerek humoral ve hücrel immüniteyi başlatır. Enfeksiyonun hiçbir döneminde viremi saptanmamıştır. Akut ve reaktif enfeksiyonda EBNA eksprese eden B lenfositleri kanda saptanabilir (3,18,19).

2.6 İMMÜNİTE

2.6.1 HÜCRESEL İMMÜNİTE

Enfekte B lenfositleri, proliferasyon sonucu giriş yerinde B lenfositlerinin artışına neden olur. Akut enfeksiyonda periferik kanda lenfoblastlar görülür ve T lenfosit yanıtını uyarak vücuda yayılır. T lenfositlerinin B lenfositleri ile reaksiyonu sonucunda ateş başta olmak üzere servikal lenf düğümlerinin şişmesi ve hastalığın ilk birkaç haftasında anormal mononükleer hücre proliferasyonu ile karakterize olan EM tablosu gelişir. EM'de süpresör T hücrelerindeki artış normalin 100 katına kadar çıkabilmektedir (3,18,20).

Akut enfeksiyonda kanda görülen Downey hücreleri adını alan atipik lenfositler yine T hücreleridir. 2. haftada kanda sayıca fazlaşır ve lökositlerin %10-80 kadarını oluşturur (mononükleoz). Lenfositozda T hücrelerinin fonksiyonlarının baskılandığını gecikmiş tip aşırı duyarlılık testi ve mitojen stimülasyon testi ile göstermek mümkündür. CD8+T lenfositlerinin yanıtının yanında CD4+T lenfositleri ve doğal öldürücü (NK) hücreleri de enfekte B lenfositlerinin temizlenmesini hedef alarak

kontrol etmeye çalışır. Ancak virus yaşam boyu konakta persistan enfeksiyona neden olur.

Hastaların çoğu 2-3 haftada kendiliğinden iyileşir. EBV'ye karşı hücrel ve humoral yanıtı rağmen virus organizmadan atılamaz. EBV'nin diğer Herpesviruslar gibi latent enfeksiyon yapma özelliği vardır. Klinik durumun düzelmesinden 12-18 ay süre ile boğaz çalkantı suyundan virusu izole etmek mümkündür. Genellikle subklinik geçirilen enfeksiyonlarda immün sistem baskılanmış ise EBV tekrar aktive olarak virus replikasyonu artar (3,5,18).

2.6.1.1 İMMÜN SİSTEMİ BASKILANMIŞ HASTALARDA YANIT

İmmünsüpresif tedavi alan böbrek nakli alıcılarındaki çalışmalar EBV replikasyon kontrolünün yüksek oranda hücrel immünite ile sağlandığını ortaya koymaktadır. Böyle hastaların orofaringeal virus salınımı artmakta ve yüksek antikor titreleri gözlenmektedir (21).

İmmün yanıt fonksiyonlarında bir bozukluk gelişirse EBV ile enfekte hücre havuzu genişlemeye baslar. EBV'nin aktive ettiği B lenfositleri lenfoma hücrelerine transforme olabilir. Transformasyonun patogeneziyle oluşan genetik rekombinasyonların onkojen aktivasyonuna imkan sunacağı ve klonal çoğalmanın kontrol dışı kalmasına T lenfositlerinin katkısı olacağı görüşü yer almaktadır (22,23).

Hastalığın kontrolünde NK hücreleri büyük önem taşır. X'e bağlı lenfoproliferatif sendromda (XLPS) bu hücrelerin eksikliği durumunda enfeksiyondan sonra lenfoproliferatif malignite gelişir (17).

2.6.2 HÜMORAL İMMÜNİTE

Primer enfeksiyonda viral antijenlere karşı humoral immün yanıt gelişir. Aynı zamanda IgM yapısında olan EBV antijenleri ile çapraz reaksiyon vermeyen heterofil antikorlar da uyarılır. EM vakalarının %90'ında pozitif olan heterofil antikorlar hastalığın 2-3 haftasından sonra pozitifleşir (8). EBV serolojisinin akut enfeksiyonu geçirilmiş enfeksiyondan ve reaktivasyondan ayırmada rolü çok büyüktür (24,26).

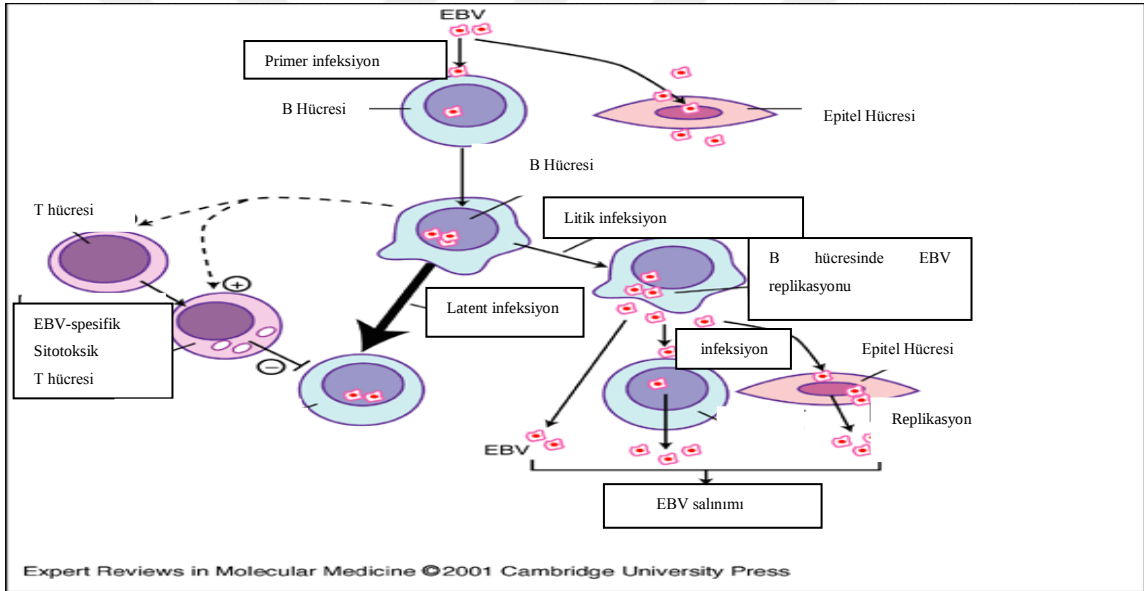
Gp350/220'ye karşı oluşan IgG antikorları 6-7 haftada en yüksek seviye ulaşır ve ömür boyu kalıcıdır (8).

Akut enfeksiyondan konvalesan döneme geçişin göstergesi olan Anti EBNA IgG antikorları hastalığın başlangıcından 3-4 hafta sonra yükselir ve ömür boyu kalıcıdır.

Anti EBNA heterofil antikorları negatif olan hastalarda tanı konulmasına yardımcı olmaktadır. İyileşen EM hastalarında Anti EBNA-2 ve anti EBNA-6 titreleri 3 ay sonra yükselirken; anti-EBNA-1 6-12 ay sonra en yüksek seviyeye ulaşır. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda ise EBNA titreleri azalır ya da kaybolur (27).

Viral replikasyon ile ilişkili olan ve litik döngüye girişin göstergesi olan anti VCA IgM antikorları akut enfeksiyon göstergesidir ve enfeksiyonun ilk haftasında görülür. 3 ay saptanabilir düzeydedir. Anti VCA IgG antikorları ise hastalığın başlangıcından 4-7 gün sonra saptanabilirken ömür boyu kalıcıdır (25,26).

EA-d IgG antikorları hastalığın 3. haftasında en yüksek seviyeye gelirken 3. ayda saptanamayan seviyelere düşer. EA-R'ye karşı oluşan antikorlar iyileşme döneminde görülür (25,26).



Şekil 2.6.2.1 Hümmoral İmmünite

2.7 EPİDEMİYOLOJİ

EBV tükürük ve boğaz salgısıyla çıkarılmakta, kontamine eşyalarla kişiden kişiye bulaşmaktadır. Yakın temasla bulaştığı için EM'ye öpücük hastalığı (kissing disease) da denilmektedir (18).

Ergenlik döneminde öpüşme, çocukluk döneminde ortak kullanılan su bardakları bulaş sebepleri arasındadır . Kan transfüzyonu, organ nakli ve muhtemelen cinsel ilişki diğer bulaş yollarıdır (18).

Çocukluk döneminde enfeksiyon asemptomatik özellik gösterirken yetişkinlerde EM tablosu görülmektedir (3,24).

Coğrafi bölgelere göre EBV enfeksiyonunun görülme yaşı değişiklik göstermektedir. Düşük sosyoekonomik düzeydeki toplumlarda enfeksiyonla karşılaşma yüksek sosyoekonomik düzeydeki toplumlara göre daha erken yaşta görülmektedir. Klinik EM’de kişinin immün sistemi, genetik, enfeksiyonla karşılaşma yaşı ve sosyoekonomik düzey önemli etkenlerdir. EBV enfeksiyonları sosyoekonomik düzeyi düşük olan toplumlarda küçük yaşlarda asemptomatik özellik gösterirken, sosyoekonomik düzeyi yüksek olan toplumlarda erişkinlerde EM görülür (5,6,17,28,29).

Yapılan bir çalışmada anti VCA IgG antikorları %71, anti EBNA IgG antikorları %54 olarak saptanmış ve düşük sosyoekonomik düzeyi olan bölgelerde kötü yaşam koşullarına bağlı olarak antikor prevalansının yüksek olduğu belirlenmiştir (30).

Çinde görülen nazofarengial karsinoma oluşumunda besin, çevresel ve genetik faktörler etkili olurken, Afrikalı çocuklarda görülen Afrika BL’sinde sıtma kaynaklı bağışıklık yetmezliğinin etkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (16). Türkiye’de HL EBV ilişkisi %55-%62.5, NHL-EBV ilişkisi %57 ve nazofaringeal karsinoma-EBV arasındaki ilişki %29 oranında bildirilmiştir (31,32).

Heterofil antikorlar cinsiyet farkı olmaksızın 4 yaşın üzerindeki kişilerin %90-95’inde bulunmaktadır. EM askeri birlik ve okullarda daha yaygın olarak belirlenmiş, aile içi yayılımın sık olduğu belirtilmiştir (18).

PCR ve serolojik çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre tip1(EBVa) ve tip2 (EBV 2)’nin dağılımının aynı olduğunu gösteren çalışmalar vardır (18).

Yapılan çalışmalarda enfeksiyon görülme sıklığının mevsim ile doğrudan ilişkili olmadığı düşünülmekle birlikte yüksek değerler ilkbahar ve yaz mevsimi sonunda görülmüştür (28). Ülkemizde toplumun %80-95’inde EBV seropozitifliği mevcuttur (26,33).

2.8 EBV ENFEKSİYONLARINDA TANI

2.8.1 Tanıda kullanılan klinik örnekler

BOS, serum, plazma, dondurulmuş doku örnekleri, tam kan EBV tanısında kullanılan uygun klinik örneklerdir. Rutin laboratuvarlarda kısa sürede çalışılacak serolojik yöntemler için kullanılacak olan klinik örnekler çalışma yapılana kadar +4 °C’de saklanmalıdır (34). Moleküler biyoloji teknikleriyle çalışılacak örneklerin ise uygulama yapılincaya kadar -20 °C’de saklanması uygundur.

2.8.2 VİRUS İZOLASYONU

Günümüzde EBV izolasyon yöntemi rutin olarak çalışılmazken, araştırma amaçlı yapılmaktadır. EM’de hasta boğaz çalkantı suyu ve lenfositlerinden hücre kültürü hazırlanmaktadır. İzolasyon için 5-10 ml boğaz çalkantı suyu antibiyotik ve fötal dana serumu (%2-5) bulunan Hanks solüsyonu içerisine konulur. Çalışma yapılincaya kadar 2-3 gün bekletilebilir. Daha fazla bekleyecek örnekler için -70 °C saklama koşulları uygundur. Karaciğer, dalak, lenf bezi, tümör biyopsisi gibi doku örneklerinde viral antijenlerin incelenmesi için hücre kültürü besiyerinin içine kontaminasyonu engellemek için antibiyotik ve antimikotik solüsyonlar ilave edilir. Taze dondurulmuş veya parafin bloklanmış enfekte dokularda EBV DNA’sı araştırılabilirken, taze biyopsi örneklerinde immünfloresan yöntemiyle antijen incelenebilmektedir (18).

2.8.3 ELEKTRON MİKROSKOPİ

EBV enfeksiyonlarında dokularda yeterli miktarda viriyon bulunmaması sebebiyle kullanımı tercih edilmeyen bir yöntemdir. Oral lökoplakili hastalarda viral yükün fazla olması sebebiyle tanıda kullanımı uygundur (34).

2.8.4 HEMATOLOJİK BULGULAR

EM’ nin erken safhasında lökosit sayısı normal seviyede veya lökopeni görülür. Lenfositöz hastalığın 2. veya 3. safhasında en yüksek seviyeye çıkarak lökosit sayısı 12 000-18 000 yada nadir olarak 30 000-50 000 olarak saptanır. Mononükleer hücreler %60-70 oranında görülür. Bunların yaklaşık %30’u anormal lenfositlerdir. Nötropeni ve trombositopeni de EBV enfeksiyonlarında görülebilir. Granülosit sayısı 2000-3000, trombosit sayısı 140 000 den daha azdır (10). EM kliniği görülmeyen hastalarda atipik lenfositöz görülmez (17).

2.8.5 SEROLOJİK TANI

EBV enfeksiyonlarının tanısında ilk tercih edilen yöntem serolojik tanıdır (27).

2.8.5.1 HETEROFİL ANTİKOR TESTLERİ

Monospot ve Paul-Bunnel testleri bu amaçla kullanılmaktadır. Bu iki yöntem ile EM'de heterofil antikorlar saptanabilmektedir. EBV ile aktiveleşen B lenfositlerinin sentezlediği IgM yapısında olan antikorlar dana, koyun, at gibi hayvanların eritrositlerinin yüzeyindeki Paul Bunnel antijenini tanır. 0-4 yaş arası çocuklarda heterofil antikorlar %10-50 oranında saptanabilirken erişkinlerde bu oran %85-90 arasındadır. Ticari ürünlerde sığır, at, keçi, eritrositleri ile kobay böbrek ekstresi kullanılarak heterofil antikorlar saptanmaktadır. Bu yöntemin otoimmün hastalarda ve gebelerde yalancı pozitiflik nedeniyle diğer testlere göre duyarlılığı düşüktür (3). Heterofil antikorlar 1-4 hafta içinde saptanabilirler. Bu antikorlar 2 yıla kadar pozitif kalabilirken, genellikle 3-6 ay içinde kaybolurlar (6,17). Hastalığın 2-3. haftasında en yüksek seviyeye ulaşırlar (35).

2.8.5.2 EBV-SPEŞİFİK ANTİKOR TESTLERİ

Heterofil antikorların veya atipik hücrelerin görülmediği EM olgularında, BL, nazofaringeal karsinomali hastalarda bu antikorların saptanması önemlidir (36). EBV serolojisi akut enfeksiyonu geçirilmiş enfeksiyondan veya reaktivasyondan ayırmak için gereklidir (26).

2.8.5.2.1 VCA antikorları

Anti VCA IgM: Hasta bireylerde 4-8 hafta pozitif kalan IgM antikorları sağlıklı bireylerde bulunmaz. Yaklaşık olarak %10 kadar olguda 4 aydan uzun süre pozitif olarak kalabilmektedir. Bu antikoru varlığı akut primer EM tanısını koydurmada yardımcıdır. Reaktivasyon ve latent enfeksiyon durumlarında ise bu antikorlar saptanmaz (36).

Anti VCA IgG: VCA IgM antikoru 4 hafta sonra saptanmazken VCA IgG antikorları ömür boyu saptanabilmektedir (18). BL, nazofaringeal karsinomali hastalardan alınan örneklerde anti VCA IgG atikoru seviyeleri sağlıklı kişilere göre 8-10 kat yüksek titrede bulunur (18).

Anti VCA antikorları indirekt immünfloresan yöntemiyle gösterilebilir (18).

2.8.5.2.2 EA antikorları

EA antikorları EA-D ve EA-R olmak üzere iki yapıda görülür. EBV ile enfekte hücrelerin nükleus ve sitoplazmalarının floresan ile boyanmasını sağlayan antikorlar EA-D antikorlarıdır. Bu antikorlar, EM'de %70 oranında saptanır ve 3-4 hafta sonra en yüksek seviyeye ulaşır. 3-6 ay sonra da kaybolur. Anti EA-D IgG ve anti EA-D IgA antikorları NFC'li hastalarda yüksek değerde saptanmaktadır (18).

Anti EA-R antikorları anti EA-D'nin kaybolmasından sonra geçici aralıklarla yaklaşık 2 yıl kadar saptanırken, genellikle atipik ve uzun süreli vakalarda daha geç saptanmaktadır. Reaktif olan enfeksiyonlarda anti EA-D veya anti EA-R pozitif olarak saptanır (5,37). EA-R antijenine karşı oluşan antikorlar iyileşme döneminde ortaya çıkmaktadır (26).

2.8.5.2.3 EBNA antikorları

Heterofil antikor negatif olan hastalarda anti EBNA antikorları tanıda kullanılır. EBNA antikorları EM'li hastaların tamamında 3-4 hafta sonra saptanmaya başlar ve ömür boyu kalır. Bu antikorlar enfeksiyonun geçirilmiş olduğunu gösterir. Konvalesan dönemde anti EBNA antikorları artış gösterir. İyileşen hastalarda anti EBNA antikor titreleri azalır. EBNA-2 ve EBNA-6 üç ay sonra yükselerek en yüksek seviyeye ulaşır. Dominant antikor komponenti EBNA-1 ise 6-12 ay sonra en yüksek seviyeye ulaşır (18). Anti VCA antikor pozitif ve EBNA antikor negatif bireylerde EBNA'nın pozitif hale gelmesi yeni EBV enfeksiyonunun göstergesidir (5,38). İmmünsüprese hastalarda anti EBNA titreleri azalır veya kaybolur (18).

2.8.5.2.4 Diğer antikorlar

EM hastalarında hastalığın başlangıcından 3-4 hafta sonra hayat boyu kalan solübl antijene karşı kompleman bağlayan antikorlar (anti-s) oluşur . Rutin tanıda kullanılmayan nötralizan antikorlar konaktaki gp350 ve gp 220 antijenlerine karşı oluşur. 4 kat titre artışı akut enfeksiyonun göstergesidir (39). Kapsid antijeni p22'ye karşı oluşan antikorlar enfeksiyonun geç döneminde oluşur (40,41).

2.8.5.2.5 Avidite

EBV enfeksiyonlarının serolojik yorumu sırasında IgM antikorlarının oluşmaması, beklenenden daha uzun süre kalması gibi nedenlerle primer enfeksiyon, reenfeksiyon ve reaktivasyon durumlarının ayırımında sorun yaşanabilmektedir. Bunun için avidite IgG testleri kullanılmaktadır (42-44). VCA IgG avidite testleri anti VCA IgM negatif akut enfeksiyon, anti EBNA 1 negatif geçirilmiş enfeksiyon tablolarında yardımcı olur (45).

2.8.5.2.6 İndirekt fluoresan yöntemi

Değerlendirilmesi deneyim gerektiren altın standart olarak görülen serolojik bir yöntemdir. Ticari olarak hazırlanmış lamalar p3HR-1 ve raji hücre dizileri ile kaplıdır. Bu yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olduğu için tek serum örneği ile çalışmaya imkan vermektedir. Anti kompleman immünfloresan testi (ACIF) diğer bir seçenek olarak kullanılabilir (3).

P3HR-1 hücreleri , anti VCA IgG, IgM, IgA antikorlarının, EA pozitif hücreler anti EA-D ve anti EA-R antikorlarının gösterilmesinde kullanılır (18).

Anti EBNA antikorlarının belirlenmesinde indirekt immünfloresan yöntemi daha duyarlıdır (18).

2.8.5.2.7 ELISA yöntemi

Enzyme Linked Immunsorbent Assay (ELISA) yöntemi, EBV enfeksiyonu tanısında kullanılan, tek serum örneği ile çalışma imkanı veren, hızlı, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip, otomasyona uygunluk göstermektedir (3). Altın standart olarak IFA görülse de EBV ile enfekte olmuş hücrelerin kullanılması, standardizasyondaki zorluk, hız bakımından karşılaşılan olumsuzluklar nedeniyle tanıda alternatif testlere bir yönelim olmuştur. VCA içindeki yüksek immünojenik özellik gösteren peptid olan p18 ve p23 ELISA yönteminde çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. EBNA antikor saptanması için EBNA-1 antijeni kullanılmaktadır. Bazı ticari kitlerde EBNA-2 ile kombine şekli vardır (46).

2.8.5.2.8 İmmünblot testler

Yüksek özgüllük göstermesi sebebiyle doğrulama testi olarak gösterilen bir yöntemdir. Viral lizat veya rekombinant antijenlerin (VCA için p18, EBNA için p72, EA için p54, p138) kullanıldığı analitik antikor saptama yöntemidir (3).

Primer akut enfeksiyon ve EBV ile ilgili serolojik durumun belirlenmesi klinik açıdan değerlendirildiğinde oldukça anlamlıdır. Ancak immünsüprese hastalarda antikor saptamaya yönelik testlerin kullanımı sınırlıdır (3).

2.8.5.2.9 Nükleik asit testleri

EBV nükleik asit testleri (NAT) EBV etiyolojisi açısından tanıda anlamlıdır. EBV-DNA kanda (lökosit, plazma, serum) NAT ile kantitatif veya kalitatif olarak saptanabilir.

PTLH tanısında dokuda EBER, farklı DNA\RNA hedef bölgesinin gösterilmesi ve LMP-1, EBNA-1 gibi antijenlerin saptanması mümkündür. EBER'in saptanması PTLH de anlamlıdır (3).

EBV-DNA, immünsüpresif hastalarda, serolojik testlerden sonuç alınamadığında ve reaktivasyon durumunda tercih edilen bir yöntemdir . Yapılan çalışmalar sonucunda günümüzde özellikle immünsüprese kişilerde EBV enfeksiyonunun saptanması ve tedavi takibinde EBV DNA kantitatif viral yük çalışmaları yaygınlık kazanmıştır.

PTLH'de kanda saptanan viral yük seviyesi pediatrik grupta erişkinlere göre daha belirgin olmaktadır (3).

İmmünsüprese hastalarda latent virus sebebiyle reaktivasyon görülmektedir. Bunun sonucunda yüksek viral yük saptanmasına rağmen kliniğin olmaması veya klinik belirtiler olsa bile viral yükün saptanamaması gibi durumlar görülebilmektedir. Saptanan EBV DNA'nın latent enfeksiyondan ayrılması ve EBV ile ilişkili olduğu düşünülen tablonun etkeni olduğunun gösterilmesi önemlidir (3).

2.9 Klinik

2.9.1 Primer enfeksiyon

Lenfatik bölgelerdeki B hücrelerini enfekte eden viruslar ile birlikte genellikle latent enfeksiyon başlar. Bazı hastalarda tonsillerdeki B hücrelerinde litik faz görülebilir. Latent B hücre havuzu, B hücrelerinde latent gen ürünlerinin replikasyonu

ve hücre proliferasyonu ile genişler. Bu latent hücreler primer enfeksiyon süresince kanda dolaşım halindedir (47). Çocukluk çağı primer enfeksiyonu genellikle hayat boyu latent olarak kalır.

2.9.2 Atipik primer enfeksiyon

En sık hepatit şeklinde görülen, heterofil antikorun saptanmadığı, atipik lenfositlerin az veya hiç olmaması ile karakterize bir tablodur (47).

2.9.3 EM

Enfekte olmamış genç ve erişkinlerin %30-45'i EBV ile karşılaştıklarında EM tablosu görülür (48). Belirtilerin görülmesi yaşla ilişkili olmakla beraber bazen bütün belirtiler görülmeyebilir. Akut EM'de klinik olarak; boğaz ağrısı, ateş, lenfadenopati, splenomegali, sarılık ve döküntüler görülür. Hematolojik bulgular incelendiğinde atipik lenfositlerin varlığı mevcuttur. Serolojik testlerin sonuçlarına bakıldığında heterofil antikor ve spesifik EBV'na karşı oluşan antikorlar saptanır (39).

Çocukluk çağında hastalık çoğunlukla asemptomatik şekilde seyreder. Semptomatik hastalıkta ise otitis media, üst solunum yolu enfeksiyonu (ÜSYE), diyare gibi belirtiler veya EM görülür (8).

EM, boğaz ağrısı, farenjit, baş ağrısı, ateş, tonsilit, ön ve arka lenf nodu tutulumu, karaciğer enzimlerinin artışı ile karakterizedir. Bu klinik tabloda %50-63 oranında splenomegali, %13 oranında hepatomegali gözlenmektedir. Komplikasyon söz konusu olmadığında nörolojik bulgular saptanmaz. Hastalık 2-3 haftada kendiliğinden iyileşme gösterir (8). EM sadece EBV tarafından meydana gelmez. Terim olarak incelendiğinde, etkenden bağımsız uzamış ateş, farenjit ve lenfadenopatinin beraber görüldüğü klinik bir tablodur. EBV ilişkili EM yada non-EBV ilişkili EM olmak üzere 2'ye ayrılır (49). Komplikasyonsuz EM nadiren ölümcüldür. Ancak laringeal obstrüksiyon, nörolojik bozukluklar veya dalak rüptürü gibi komplikasyonları görülebilir (27). Yeni doğan ve küçük çocuklarda EM asemptomatik seyirlidir ve çok nadir olarak diyare, ÜSYE ve EM şeklinde görülebilir .

2.9.4 Kronik aktif (persistan) enfeksiyon

Kronik aktif EBV enfeksiyonu ciddi malignitelere veya ölümcül hastalıklara dönüşen EBV ile ilişkili duruma verilen isimdir (34). Klinik ve laboratuvar bulguları

arasında pnömoni, trombositopeni, hipogammaglobulinemi, eozinofili sayılabilir. Bu tablonun patogenezi tam açıklanamamakla birlikte, EBV replikasyonunun baskılanamamış olduğu görüşü vardır. Bu klinik durum incelendiğinde, EA ve VCA kompleksinin yüksek antikor düzeylerine sahip olduğu, EBNA'nın düşük titrelerde veya hiç saptanmadığı bildirilmiştir (50-51). Hastalık EM tablosunun yıllar boyu devam eden sendromu şeklinde görülmektedir .

2.9.5 İmmünkompetan kişilerde oluşan malign hastalıklar

2.9.5.1 Burkitt Lenfoma (BL)

BL ilk olarak 1958 yılında Burkitt tarafından Afrikadaki çocukların çene bölgelerinde tanımlanmıştır (52). Endemik, sporadik, immün yetmezlikli kişilerdeki şekil olmak üzere 3 klinik şekli vardır. Endemik form Papua yeni Gine ve Afrikada yaygın olup dünyanın diğer yerlerinde insidansı düşüktür. Sporadik form coğrafi konum fark etmeksizin genç ve çocuklarda görülür (53). BL'da EBV-DNA saptanabilirliği endemik bölge dışında %20 oranlarında görülür. Amerika ve Avrupada sporadik form nadir görülür. C-myc onkojeni hücre çoğalmasında görev alır ve gen bölgelerine translokasyonu sonucu anormal hücre proliferasyonu meydana gelir. BL'da endemik veya sporadik tüm formlarda saptanır (54).

2.9.5.2 Hodgkin Lenfoma (HL)

HL lenfoid kökenli olan Hodgkin ve read-sternberg hücrelerinin ismini almıştır. Viral genomun saptanması ve yapılan çalışmalarda EBV ile ilişkili sonuçların varlığı, bu klinik tablonun virus ilişkisini desteklemiştir (55).

2.9.5.3 Nazofaringeal karsinom

Nazofaringeal karsinom (NPC)'un Kuzey Afrika ve güney Çin'de görülme sıklığı oldukça yüksektir (8). Nonkeratinize ve keratinize NPC olmak üzere iki formu vardır (56). Hastalarda yüksek titrede IgA antikorları oluşur ve titreleri yüksektir. Güney Çin'de spesifik IgA antikorunun ölçümü NPC'nun erken tanısında kullanılmaktadır. Antikor titresi arttıkça hastalığın seyrinde kötüleşme görülür (54).

2.9.6 İmmünsüprese hastalarda görülen klinik tablolar

2.9.6.1 Post transplant lenfoproliferatif hastalıklar (PTLH)

Kronik immünsüpresif tedavi gören kalp, böbrek ve kemik iliği transplantasyon hastalarındaki PTLH sıklığı oldukça yüksektir. PTLH’da ortaya çıkan erken lezyonlar poliklonal, geç lezyonlar monoklonaldır. Lezyonlarda viral genom ve antijenlerin gösterilmesi, primer veya reaktif EBV enfeksiyonunun varlığı bu hastalıklardaki EBV’nin önemini göstermektedir (22,50,57).

EBV-DNA ve EBERs lezyonlarda moleküler yöntemlerle gösterilmesi önem taşımaktadır . Serum immünglobulin seviyelerinde artma EBNA antikorları titrelerinde düşme görülebilir (22,50,58).

2.9.6.2 Nonhodgkin lenfoma (NHL)

İmmün sistemi baskılanmış hastalarda HL’ye göre görülme sıklığı daha yüksektir. AIDS hastalarında B hücre kökenlidir ve ekstra nodül tutulumları daha fazladır. Santral sinir sistemi lenfomalarında %90’dan fazla EBV ilişkili olduğu gösterilmiştir (22,23,57,59).

2.9.6.3 X’e bağlı lenfoproliferatif sendrom (XLPS) (Duncan hastalığı)

Bu sendromun en önemli belirtileri fatal EM, malign lenfoma, hemafagositik sendrom, aplastik anemi, hipogammaglobulinemi ve bakteriyel enfeksiyonlar olarak tanımlanır.

XLPS’de T lenfosit sinyal yolu üzerinde genetik bir eksiklik olduğu ve bunun fatal EM, proliferasyona veya malign lenfoma gelişimine neden olduğu görüşü yaygındır (22,50,51,57).

2.9.6.4 Enfeksiyonu önleme

Virusun asemptomatik yayılma potansiyelinin yüksek olması enfeksiyonun önlenmesini zorlaştıran nedenler arasında önemli bir yer tutmaktadır (1). Sosyoekonomik koşulların düzeltilmesi ve hijyen şartlarının iyileştirilmesi önemlidir (29). PTLH için EBV viral yükünün özellikle immün sistemi baskılanmış transplant hastalarında düzenli bir şekilde takip edilmesini öneren çalışmalar mevcuttur (3).

2.10 Tedavi

EM’de tedavi yaklaşımı destek tedavisidir. İmmünsüpresif tedavinin kesilmesinin veya azaltılmasının, antiviral ajanların ve kemoterapinin bağışıklığı baskılanmış hastalarda yararlarının kısıtlı olduğu görülmüştür (3). Parenteral veya oral kullanılan asiklovir EM’de virusun orafarinksten yayılmasını önlediği gösterilmiştir .

EBV ile ilişkili tümörlerde kemoterapi ve cerrahi girişimlerin önemi büyüktür (6,60). Kemik iliği transplantasyonunda vericiye ait lökosit infüzyonları gibi yaklaşımlar baskılanmış, T hücre yanıtının yeniden yapılandırılması için denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır (3).

2.11.Korunma

Virusun gp350’sine karşı oluşan antikorlar membran reseptörlerine bağlanarak virusu nötralize eder. EBV gp 350 içeren aşı çalışmalarında hayvanları lenfomadan koruduğu gözlenmiştir. Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak aşı üzerindeki çalışmalar devam etmektedir (5,18,61).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik kurulunun izni (05.05.2011 tarihli 980-585) ile yapılmıştır.

3.1 Materyal seçimi ve çalışma programı

İstanbul Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji-Onkoloji kliniğinden 2010-2011 yılları arasında Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı laboratuvarlarına EDTA'lı tüplerde gönderilen 4000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiş, EBV DNA'sı pozitif saptanmış ve plazma örnekleri çalışma zamanına kadar -20 °C'de saklanmış 50 çocuk hasta örneği kullanılmıştır. Bu örnekler 1.5 ml ependorf tüplerine alınmış ve H1, H-50'ye kadar olmak üzere kodlanarak etiketlenmiştir.(34)

Kontrol grubu için İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı laboratuvarlarına EDTA'lı tüplerde gönderilen 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş, EBV DNA negatif olarak saptanmış ve plazma örnekleri çalışma zamanına kadar -20 °C'de saklanmış 45 hasta örneği kullanılmıştır. Bu örnekler 1.5 ml ependorf tüplerine alınmış ve K1, K-45'e kadar olmak üzere kodlanarak etiketlenmiştir.

Hasta grubu ve kontrol grubu plazmalarında immünblot yöntemi ile virus serolojisini araştırma amacıyla Euroimmun EBV IgM profile-2 ve Euroimmun EBV IgG profile-2 kitleri kullanılmıştır. Bu kitlerde bulunan IgM sınıfından VCAgp125, VCAp19, EBNA-1, P22 ve EA-D antijenlerine karşı oluşan antikorlar, IgG sınıfından VCAgp125, VCAp19, EBNA-1, P22 ve EA-D antijenlerine karşı oluşan antikorların durumu araştırılmıştır.(3)

Test çalışması kit solüsyonlarının hazırlandığı gün yapılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesi ise çalışmanın bittiği gün Euroscan cihazıyla gerçekleştirilmiştir.

Sonuçlar kaydedilerek değerlendirme sonunda kontrol grubu sonuçları ile EBV DNA negatif sonuçları, hasta grubu ile EBV DNA pozitif sonuçları karşılaştırılmış, gerekli hesaplamalar yapılarak grafikler hazırlanmıştır.

3.2 Gereçler

Derin dondurucu (Uğur, Türkiye)

Buzdolabı (Bosch, Almanya)

Immunblot EBV IgM profile-2 (Euroimmun, Almanya)

Immunblot EBV IgG profile-2 (Euroimmun, Almanya)

EDTA'lı tüp

Santrifüj (Rotuna38)

Ependorf tüpü (1.5 mL)

Pipet ucu (0-200uL)

3.3 Testin yapılışı

- 1- Çalışma, 2 °C ile 8 °C arasında saklanan kitlerin çalışma prosedürüne uygun olarak yapılmıştır.
- 2- Kit içindeki tüm reaktifler kullanımdan yaklaşık 30 dakika önce buzdolabından çıkartılıp oda sıcaklığına (18 °C-25 °C) getirilmiştir.
- 3- 10X konsantrasyondaki Universal buffer distile su ile 1:10 oranında sulandırılmıştır. 50X konsantrasyondaki pozitif kontrol 1:51 oranında Universal buffer ile sulandırılmıştır. 10X konsantrasyondaki enzim konjuge 1:10 oranında sulandırılmıştır.
- 4- Hastalara ait plazma örnekleri 1:51 oranında Universal buffer ile sulandırılarak vortexlenmiştir.
- 5- İmmünblot çalışma şeritlerine EBV IgM şeritleri yerleştirilmiş ve her kanala 1.5mL Universal buffer eklenmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında çalkalayıcıda 15 dakika inkübe edilmiştir.
- 6- Kanallardaki mevcut sıvılar aspire edilmiştir.
- 7- Kanallarda bulunan test bantlarının üzerine uygun oranda sulandırılmış hasta örnekleri 1,5 mL eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 8- Kanallarda bulunan sıvı aspire edilmiş, her kanala 1.5 mL Universal buffer eklenerek 3x5 dakika çalkalayıcıda yıkanmıştır.
- 9- Kanallardaki sıvı aspire edilmiştir.
- 10- Her kanala 1.5 mL uygun oranda sulandırım yapılmış enzim konjuge IgM ilave edilmiştir. Daha sonra 30 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.
- 11- Kanallardaki sıvı aspire edilmiş daha sonra her kanala 1.5 mL Universal buffer eklenerek 3x5 dakika çalkalayıcıda yıkanmıştır.

12- Kanallardaki solüsyon aspire edilmiştir.

13- Her kanala 1.5 mL substrat ilave edilerek 10 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.

14- İnkübasyon sonunda kanallardaki sıvı aspire edilmiş ve her kanala 1.5 mL distile su eklenerek 3x1 dakika çalkalayıcıda yıkanmıştır.

15- Kanallardaki sıvı aspire edilmiştir.

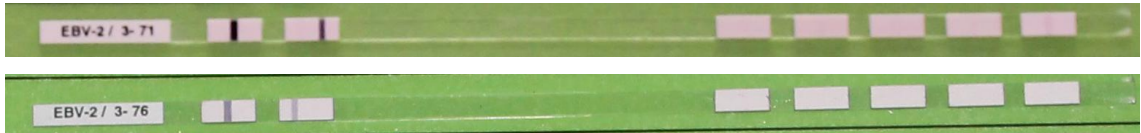
16- Son aşamada şeritler kurutularak Euroline scan cihazında değerlendirilmek üzere hazırlanmıştır.

İmmünblot EBV IgG testi çalışılırken immünblot EBV IgM çalışma protokolünün aynısı uygulanmış, sadece konjüge aşamasında uygun oranlarda sulandırımı yapılmış IgG enzim konjüge reaktifi kullanılmıştır. Daha sonra şeritler kurutularak Euroline scan cihazında değerlendirilmek üzere hazırlanmıştır.

3.4 DEĞERLENDİRME

3.4.1-Seronegatif

Anti VCA IgM(-), anti VCA IgG(-), anti EBNA IgG(-), anti EA-D IgG (-) olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.1.1.1 Seronegatif İmmünblot çalışması

3.4.2-Akut enfeksiyon

Anti VCA IgM(+), anti VCA IgG(+/-), anti EBNA IgG(-), anti EA-D IgG (+/-) olarak değerlendirilmiştir.

3.4.3-Geçirilmiş enfeksiyon

Anti VCA IgM(-), anti VCA IgG(+), anti EBNA IgG(+), anti EA-D IgG (-) olarak değerlendirilmiştir.

3.4.4-Reaktivasyon

Anti VCA IgM(+/-), anti VCA IgG(+), anti EBNA IgG(+), anti EA-D IgG (+) olarak değerlendirilmiştir.

3.5 ANALİZ

Test sonuçları Euroline scan cihazı kullanılarak değerlendirilmiştir.

No		Hasta Kimliği Hasta adı Test		EUROLINE / Allergy / EUROASSAY					Westernblot				
				Kisaltma <i>Intensite</i> Değerlendirme					Sonuç tarihi Sonuç		Kisaltma		
											<i>Intensite</i> Değerlendirme		
1	IGM IGM EBV2.1 EL_IgM	ET o	Co +++	M ++	G o	EAD o	p22 o	EBN o	p19 o	125 o			
		EBV-2 / 3-74											
		ET	Co	M	G	EAD	p22	EBN	p19	125			
		-1	69	40	-1	2	1	2	1	0			
		0	+++	++	0	0	0	0	0	0			
2	IGM IGM EBV2.1 EL_IgM	ET o	Co +++	M ++	G o	EAD o	p22 o	EBN o	p19 o	125 o			
		EBV-2 / 3-75											
		ET	Co	M	G	EAD	p22	EBN	p19	125			
		-1	70	30	-1	0	0	0	0	0			
		0	+++	++	0	0	0	0	0	0			

Şekil 3.5.1 Euroline Scan Cihazı Analiz Sonuç Tablo Örneği

3.6 DEĞERLENDİRME TABLOSU

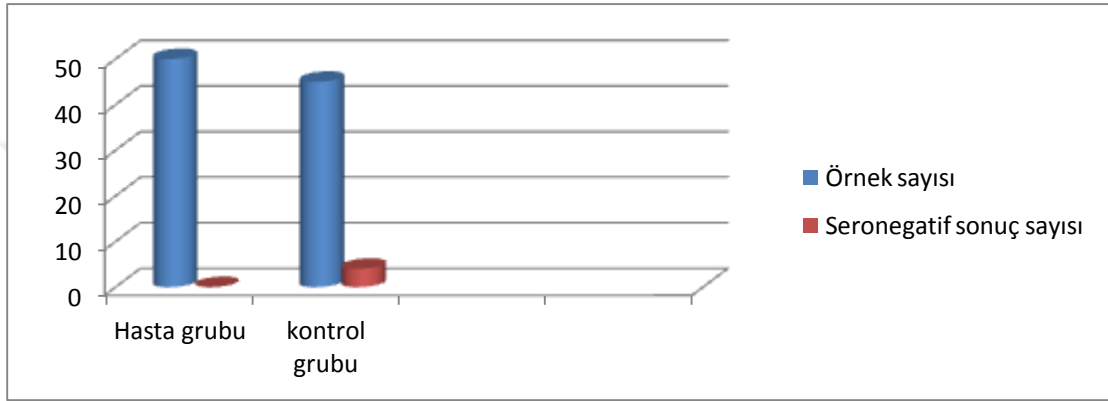
Değerlendirme ticari kit içerisindeki çalışma prospektüsüne göre yapılmıştır.

Bant	Euroline scan	Sonuç
Yok	0-5	Negatif / o
Zayıf bant	6-10	Sınır değer / (+)
Belirgin bant	11-25,26-50	Pozitif / +,++
Çok belirgin bant	>50	Güçlü pozitif / +++

Şekil 3.6.1 Analiz Sonuçlarındaki bantların değerlendirilmesi

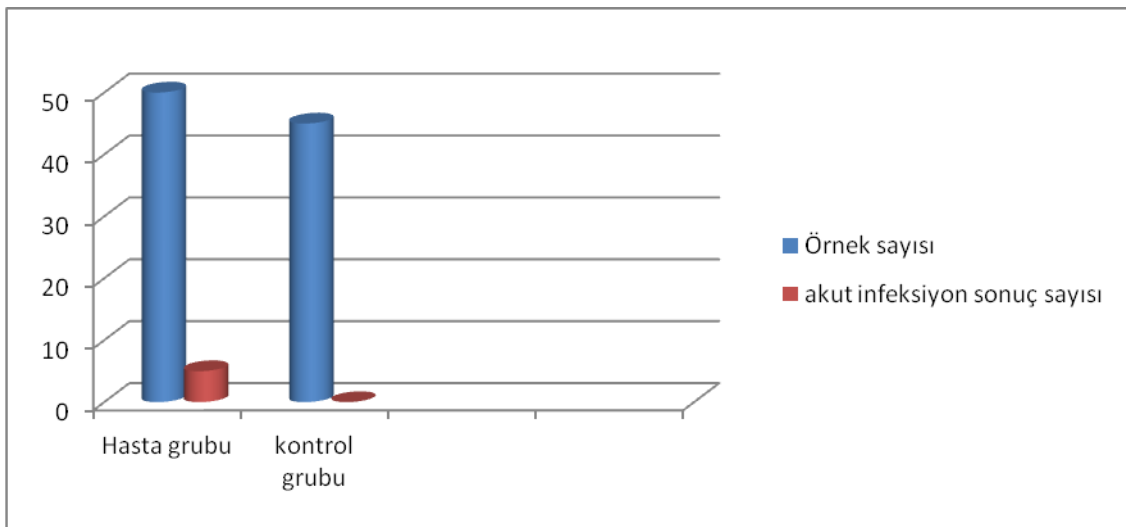
4. BULGULAR

EBV DNA'sı pozitif sonuç veren 50 çocuk hastaya ait örneklerin hiçbirinde seronegatiflik saptanmamıştır. EBV DNA sonucu negatif olan 45 örneğin çalışıldığı kontrol grubunda ise 4 örnek seronegatif olarak belirlenmiştir. EBV DNA pozitif hastalarda seronegatifliğin görülmemesi, EBV DNA negatif hastalarda seronegatifliğin saptanması anlamlı bulunmuştur.



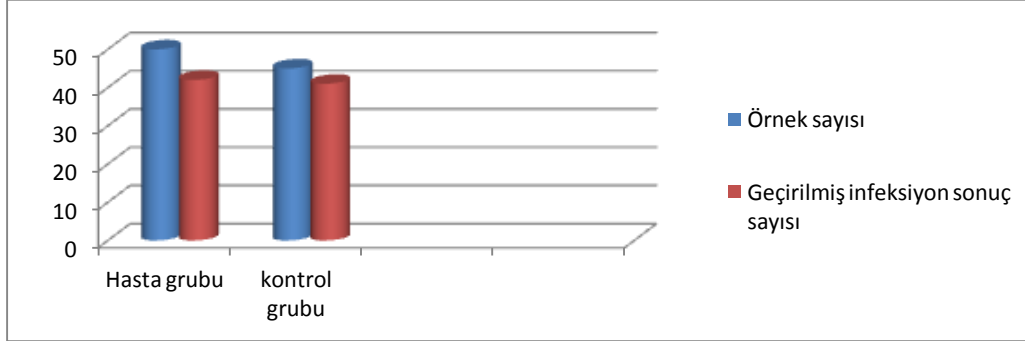
Şekil 4.1 Seronegatif sonuçların gruplardaki dağılımı

Hasta grubunu oluşturan 50 örnekten 5 tanesinde akut enfeksiyon serolojisine rastlanırken, kontrol grubu 45 örnekten hiçbirinde serolojik açıdan akut enfeksiyon tablosu görülmemiştir. EBV DNA pozitif örneklerde akut enfeksiyon serolojisi tablosunun görülmesi ve kontrol grubunda akut enfeksiyon serolojik yanıtının olmaması anlamlı bulunmuştur.



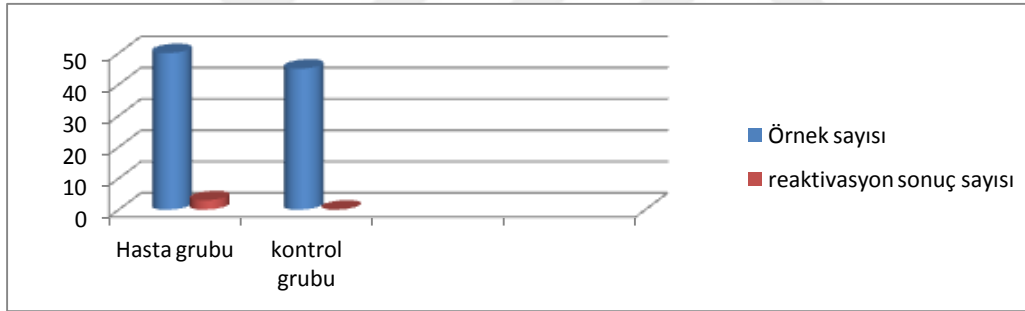
Şekil 4.2 Akut enfeksiyon sonuçlarının gruplardaki dağılımı

Hasta grubuna ait 50 örneğin 42'sinde geçirilmiş enfeksiyon serolojisi gözlenirken, kontrol grubunda yer alan 45 örneğin 41'inde bu serolojik tablo belirlenmiştir.



Şekil 4.3 Geçirilmiş enfeksiyonun gruptaki dağılımı

Hasta grubuna ait 50 örneğin 3'ünde reaktivasyon serolojisi gözlenirken, kontrol grubuna ait örneklerde bu serolojik tabloya rastlanılmamıştır.



Şekil 4.4 Reaktivasyon sonuçlarının dağılımı

Hasta grubunda yer alan immünsüpresif 3 çocuk hastanın örneğinde anti VCA IgM (+), anti VCA IgG (+), anti EBNA IgG (+), anti EA-D IgG (-) serolojik yanıtına rastlanmıştır. Yorumlanması tartışmalı olan bu profil reaktivasyon olarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubuna ait örneklerde bu serolojik tabloya rastlanılmamıştır.

4.1 HESAPLAMALAR

Kikare testine göre; hasta ve kontrol grubu dağılımları arasında ileri düzeyde anlamlı fark saptanmıştır ($p=0.008$) $\chi^2=11.78$

5. TARTIŞMA

Günümüzde yapılan çalışmalar göz önüne alındığında EBV enfeksiyonları, Dünya genelinde yüksek prevalansı ve hastalarda farklı klinik tablolara neden olması sebebiyle gün geçtikçe önem kazanmaktadır . EBV enfeksiyonları çoğunlukla çocukluk döneminde görülmekte olup, asemptomatik özellik gösterir (62). EBV enfeksiyonlarının tanısında EBV major antijenlerine karşı oluşan antikorların belirlenmesi ve EBV-DNA'nın kantitatif olarak saptanmasına imkan sağlayan yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır (63).

Enfeksiyon hastalıkları etkenlerinin tanısında kullanılan laboratuvar yöntemlerinin özgüllüğünün ve duyarlılığının yüksek olması doğru sonuçlar elde etmek açısından önem taşır. Son yıllarda hastaların kliniği açısından önem kazanan EBV serolojisi yöntemleri, özellikle akut enfeksiyonu geçirilmiş enfeksiyon veya reaktivasyondan ayırmada yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Antikor oluşumunun kısıtlı olduğu immünsüpresif hastalarda reaktivasyonun belirlenmesi klinik değerlendirme açısından önem taşımaktadır (64).

EBV enfeksiyonlarının tanısı immünsüprese ve immünkompetan bireylerde değişiklik göstermektedir. İmmünsüprese hastalarda EBV replikasyonunun saptanması, en erken sonuç veren ve tedavi sürecini belirleyen tanı metodu olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak EBV-DNA kantitatif olarak saptanabilmektedir. İmmünkompetan hastalarda da EBV serolojik profilinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (64).

Günümüzde EBV enfeksiyonunun serolojik tanısında rutin olarak uygulanan ve farklı teknikleri kullanan ticari test kitleri bulunmaktadır (65). Serolojik testlerden olan IFA yöntemi güvenilir sonuçlar vermekle birlikte testin değerlendirme aşamasında deneyimli personele ihtiyaç duyulması ve sübjektif olması sebebiyle tanıda dezavantaj oluşturabilmektedir. ELISA yöntemi ise her parametre için ayrı ayrı değerlendirme gerektirmesi nedeniyle güvenilirliğinin yanında tanıda dezavantajlı bir tablo oluşturmaktadır. İmmünblot testleri rekombinant antijenler kullanılarak üretilmekte olup Bauer tarafından tanıda altın standart olarak değerlendirilen bir yöntem olduğu ileri sürülmüştür (64).

Viral replikasyon sonucu oluşan EBV reaktivasyonu çok sık görülen bir durum olmakla birlikte özellikle bu tablonun immünsüpresif bireylerde geçirilmiş enfeksiyondan ayrımı da klinik açıdan büyük önem taşımaktadır. Transplantasyon hastaları için reaktivasyonun önemli olduğu bildirilmiş ve transplantasyon öncesi seronegatifliğin raporlanmasının yanında klinik bulgular oluşmadan aylar önce saptanabilen EBV-DNA'nın belirlenmesinin de yüksek riskli hastalar için tedavi protokollerinin oluşturulmasında önemli olduğu vurgulanmıştır (64).

Sanem ve ark (66) immünblot yöntemi ile Paul Bunnel testi yöntemini karşılaştırdıkları çalışmada sonuçların klinik tanı ile değerlendirildiğinde çocuk yaş grubunda bir hastada immünblot tekniği ile akut enfeksiyon saptanırken, Paul Bunnel testi ile negatif sonuç saptanmıştır. XLPS tablosuyla takipte olan çocuk EBV enfeksiyonu tanısı almıştır.

Michelak ve ark (67) pediatrik onkoloji hastalarında DNA analizinin serolojik yöntemler ile birlikte değerlendirilmesi gerekliliğini savunmuştur.

Çalışmamızda pediatrik onkoloji kliniği hastalarından laboratuvarımıza gönderilen EBV-DNA'sı pozitif saptanmış 50 immünsüpresif çocuk hasta plazma örneği ve EBV-DNA'sı negatif saptanmış 45 immünkompetan çocuk hastanın plazma örnekleri immünblot yöntemiyle çalışılarak, serolojik profilleri EBV-DNA sonuçlarıyla karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Sık görülen EBV reaktivasyonunun geçirilmiş enfeksiyon ve akut enfeksiyondan ayrımı immünsüpresif hastalar için büyük önem taşır (26). Çalışmamızda immünblot yöntemi kullanılarak immünsüpresif hastaların serolojik profilleri incelendiğinde EBV DNA'sı pozitif bulunan plazma örnekleri geçirilmiş enfeksiyon ve reaktivasyon olarak değerlendirilmiştir. Hasta grubundan 42 hasta geçirilmiş enfeksiyon, üç hasta ise reaktivasyon olarak belirlenmiştir.

EBV enfeksiyonunun moleküler tanısında kullanılan yöntemler EBV genomunun hızlı ve kantitatif ölçümüne olanak sağlamaktadır. Ancak EBV-DNA saptamak için örnek türü, tekniği ve viral yük değerleri arasında ortak bir fikir oluşturulamamıştır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerin uluslararası olarak standardize edilmesi gerekliliği savunulmuştur (62).

Rosemary ve ark (68) geçirilmiş enfeksiyon ve akut enfeksiyon tanısı olan kişilerde EBV-DNA viral yük araştırması yapmışlar ve geç enfeksiyonda %4, akut enfeksiyonda %70 oranında EBV-DNA saptamışlardır. Araştırmacılar, PCR yönteminin

immünsüprese hastalarda tanıda kullanılabileceğini, fakat akut enfeksiyon tanısında ise serolojik testlerin öncelikli olduğunu bildirmişlerdir.

EBV DNA'nın araştırılması reaktivasyonun tanısında önem taşımaktadır fakat tek bir viral yük çalışmasıyla bunun mümkün olamayacağı belirtilmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde kandaki viral yükün zaman içerisindeki seyrini bilmek önem taşımaktadır. Sonuç olarak; EBV DNA hem reaktivasyon hem de primer enfeksiyonda kanda pozitif bulunmakla birlikte bu iki tablonun ayrımının tek bir örnekten çalışılan test ile mümkün olamayacağı belirtilmiştir (69).

Wagner ve ark (70) HL hastalarından alınan 24 seropozitif örneğin 13'ünde moleküler testlerle EBV-DNA'yı saptamışlar ve eş zamanlı alınan örneklerden elde edilen anti-EA IgG sonuçları ile bir korelasyonun olmadığını bildirmişlerdir.

Jabs ve ark (71) böbrek transplant hastaları ile yaptıkları çalışmada EBV-DNA negatif 10 hastanın 3'ünde, EBV-DNA pozitif 13 hastanın 4'ünde reaktivasyon saptayarak serolojinin erken EBV reaktivasyonu tanısına yardımcı olmadığını savunmuşlardır.

Chan ve ark (72) primer EBV enfeksiyonunun tanısında EBV DNA testinin özgüllüğünü %94, duyarlılığını %80 olarak bildirmiş, tanıda avidite testleri ile birlikte genişletilmiş serolojik yöntemlerinde altın standart olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Altuğlu ve ark (65) yaptıkları çalışmada immünblot testi ile anti VCA IgG pozitif örneklerin %96.5'inin IFA yöntemi ile doğrulandığını belirtmişlerdir. İmmünblot yöntemi ile anti VCA IgG negatif örneklerin %66.7'si IFA testi ile pozitif olarak saptanmıştır. Oluşan farklılığın kullanılan antijen sistemlerinin farklılığından kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Özellikle immünblot yöntemi ile atipik profil saptanan örneklerin IFA testi ile tekrar çalışılması gerektiğini öne sürmüşlerdir. İmmünblot yönteminin IFA ile uyumluluk oranı anti VCA IgG için %85.4, anti VCA IgM için %27.8 olarak bildirilmiştir. Ancak örnek sayılarının az oluşu ve ELISA gibi başka yöntemlerin uygulanmayışını sınırlandırıcı bir sebep olarak gören araştırmacılar, immünblot yöntemiyle anti VCA IgM ile alınan pozitif sonuçların yüksek yalancı pozitiflik oranını ortaya koyarak doğrulanması gerektiğini belirtmişlerdir.

EBV enfeksiyonunda immünsüpresyon durumlarında EBV reaktivasyonu saptanabilmektedir. Bu hastalarda EA antikorlarının kantitatif ölçümü önerilmektedir.

EA antikorlarının diğer parametrelerle birlikte yorumlanması gerektiğini, tek başına değerlendirilmesinin tanıyı doğrulamadığı belirtilmiştir (63).

Çalışmamızda EA-D antikoru, hasta ve kontrol gruplarında immünblot yöntemiyle incelenmiştir. Ancak ölçümler kalitatif olarak yapılmış ve tanı açısından anti VCA, anti EBNA-1 antikorlarının sonuçlarıyla beraber yorumlanmıştır.

İmmünsüpresif hastalarda anti EBNA-1 antikorlarının oluşmaması nedeniyle anti EBNA-1 IgG antikorları uzun bir süre negatif olarak saptanabilir. Tartışmalı serolojik profillerin VCA-IgG avidite, nükleik asit yöntemleri ve IFA testinin sonuçları ile birlikte yorumlanması gerektiği vurgulanmıştır (64).

Çalışmamızda anti EBNA-1 eksikliğine bağlı geçirilmiş enfeksiyon saptanmamıştır. Çalışmamızdaki hasta grubundan 50 çocuk hastanın üçüne ait sonuçlarda anti VCA IgG (+), anti VCA IgG (+), anti EBNA-1 IgG (+), anti EA-D IgG (+) gibi tartışmalı profil örnekleri bulunmuştur. Reaktivasyon serolojisi olarak belirtilen bu profilin diğer serolojik testlerle de doğrulanmasının gerekli olduğu düşüncesindeyiz.

Sonuç olarak, immünsüprese hasta grubu örneklerinde EBV reaktivasyonunun saptanması için immünblot yönteminin yetersiz kalacağını, immünkompetan hastalarda ise EBV-DNA negatif saptanmasına rağmen serolojik profilin gösterilmesi için immünblot yönteminin kullanılabileceğini, immünblot testinin immünsüprese hasta grubunda PCR testlerine alternatif değil yorumlanmasında yardımcı olarak kullanılabileceğini, maliyet açısından değerlendirildiğinde immünsüprese hastalarda immünblot yönteminin tek başına enfeksiyonu saptamada yetersiz olduğundan avantaj sağlamayacağını, moleküler yöntemlerle çalışılan immünsüprese hastalara ait olan plazma örneklerinin sayılarının artırılmasını ve klinik seyri takip edilerek irdelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- 1-Başustaoğlu C. Epstein-Barr Virus. Tıbbi Mikrobiyoloji. Atlas kitapçılık, Ankara. 2010.
- 2-Kieff E, Rickinson B: Epstein-Barr virus and its replication.In: Fields BN, Howley PM, Griffin DE, Robert A, Lamb D, Malcolm A, Martin MD, Roiznan B, Straus SE, Knipe DM(eds), Virology 2001,4.baskı.Lipincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2511-573
- 3-Erensoy S, Zeytinoğlu A. Epstein Barr virüs. Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi.3.baskı.Nobel Tıp Kitabevi ;2008: 1672-79.
- 4-Littler E, Hallibunon IW, et al.Immunological conservation between EBV and herpes simplex virus.J Gen Virol 69:2021-31.1988
- 5-Schooley RT. Epstein-Barr virus (infectious mononucleosis).In Mandell, Dougleas and Bennet's principles and Practice of infectious diseases, fourth edition, volume II. USA. P.1364-73. 1995.
- 6-Miller G, Katz BZ. Niederman JC. EBV infections. In Krugman S ed. infectious disease of children.9.edition,USA. Pp 87-104, 1992.
- 7-Yaung LS, Murray PG. EBV and oncogenesis: from latent genes to tumours.Oncogene 2003; 22: 5108-21.
- 8-Beaulieu BL, Sullivan JL. Epstein-Barr virus. Clinical Virology 2nd ed. 1999; 479-495.
- 9-Neidobitek G, Meru N, Delecluse HJ. Epstein-Barr virus infection and human malignancies.Int J Exp Pathol 2001; 82: 149-70
- 10-Robertson KD, Ambinder RF..Mapping Promoter regions that are hypersensitive to methylation-mediated inhibition of transcription: application of the methylation cassette assay to the Epstein Barr virus major latency promoter.1997; 71(9): 6445-54.
- 11-Tomkinson B, Robertson E, Kieff E.Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. 1993; 67(4): 2014-25
- 12-Allan GJ, Inman GJ, Parker BD, Rowe DT, Farrel PJ.Cell growth effects of EBV leader protein.J. Gen Virol 1992; 73:1547-51.

- 13-Middeldorp JM, Brink AA, Van den Brule AJ, Meijer CJ.Pathogenic roles for EBV gene products in EBV-associated proliferative disorders.Crit Rev Oncol. Hematol. 2003; 45(1):1-36
- 14-Mellinghoff I, Daibata M, Humphreys RE, Mulder C,Takada K, Sairenji T, Early events in EBV genome expression after activation: Regulation by second messengers of B cell activation. 1991;185:922-8.
- 15-Packham G, Brimmel M, Cook D, Sinclair AJ, Farrel PJ.Strain variation in EBV Immediate-early genes.1993;192:541-50
- 16-Erensoy S, Zeytinoğlu A. Epstein –Barr virus.Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi.3.baskı. İstanbul: Nobel kitabvi; 2008. 1677-8.
- 17-Fleisher GR. EBV, in Belske RB ed. Textbook of human virology. Second edition., USA. Pp862-88,1991.
- 18- Ustaçelebi Ş. Epstein-Barr Virusu, In: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara.1999: 843.
- 19-Thorley-Lawson DA. Immunological responses to EBV infection and the pathogenesis of EBV-induced diseases.Biochim et Biophys 948:263-86, 1988.
- 20-Haider S, Coutinho ML. Emond RTD, Sutton RNP.Tuberculin anergy and infectious mononucleosis. Lancet July 14:74, 1973.
- 21-Allday MJ, Crauford DH.Role of epiteliu in persistance and pathogenesis o B cell tumours. Lancet Apr 16: 855-5, 1988
- 22-Gross TG,Shirami zu B, Pizzo PA, Poplack DG. Principles and Practice of Pediatric Oncology 5th edition. Lippincott Williams and Wilkins, 2006; 695-721.
- 23-Weinstein HJ, Hudson MM, Link MP. Pediatric Lymphomas.Springer-Verlag-Berlin-Heilderberg 2007.
- 24-Müderriş T. Larenks Kanserli hastaların Tümör dokularında Epstein-Barr virusun gerçek zamanlı Polimeraz zincirleme reaksiyonu ile saptanması(uzmanlık tezi).Ankara; Gazi Üniversitesi.2009.
- 25-Fung MK, Mordarski KT, Bader SA, Grnowski AM. Evaluation of the wampole Laboratories Elisa-based assay for EBV serology.Clin Chimica Acta 2002;319: 43-8
- 26-Fidan I, Yuksel S, İmir T. Değişik yaş gruplarında EBV antikorlarının araştırılması. Turkish Journal of infection 2005; 19 (4): 453-6

- 27-Tuncer S, Ustaçelebi Œ, EBV. In: Ustaçelebi Œ, editör. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1st ed. Ankara: GneŒ pres, 1999; 843-8
- 28-Evans AS, Niederman JC. EBV , in Evans AS ed. Viral infections of humans,second edition, NewYork. 1988: 265-92.
- 29-Ambinder RF, Mann RB. Detection and characterization of EBV in clinical specimens. Am J Pathol 145 (2): 239-52, 1994
- 30-Figueira-Silva CM, Pereira FEL. Prevalence of EBV antibodies in healthy children and adolescents in Vitoria, State of Espirito Santo, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2004; 37: 409-12
- 31-Zeytinoglu A, Hekimgil M, Erensoy S ve ark. Lenfomalı hastaların dokularında EBV-DNA ve RNA sınır araştırılması. Mikrobiyoloji Blteni 2005; 39: 473-81.
- 32-Ertem U, Duru F, Pamir A, et al.Burkitt Lymphoma in 63 turkish children diagnosed over a 10 year period. Pediatr Haematol Oncol 1996; 13: 123-34.
- 33-Topkaya A, Aksungar F, zakkaŒ F, Akıncı N. An infectious mononucleosis case. J med Sci 2007; 27:279-81.
- 34-Linde A.EBV. In: Murray editors.Clinical Mikrobiology 8th ed. Washington:Rp ASM Pres, 2003; 1331-40.
- 35-Ho DWT,Fiels PR, Cunningham AL.Rapid diagnosis of acute EBV infection by an indirect ELİSA for specific IgM antibody without rheumatoid factor and specific IgG interference. J Clin Microbiol 27(5) : 952-58,1989.
- 36-Black JM, Edwards JM, Fletcher W, MCswikgun, DA, pereira MS. Measurement of heterophil antibody and antibodies too EB viral capsid antigen IgG and IgM in suspected cases of infectious mononucleosis. J Clin Pathol. 1976 Sep; 29 (9): 841-7.
- 37- Honvitz CA. Henle W, Henle G, et al. Long term serological follow up of patients for EBV after recovery from infectious mononucleosis. J Infect Dis 151 (6). 1150-52.1985.
- 38- Royston I. EBV and Infectious mononucleosis. Lanced Nov 17: 1152, 1973.
- 39- Ustaelebi, Œ. (Ed.) temel ve klinik mikrobiyoloji. GneŒ kitap evi, Ankara, 1999.
- 40- Leogrande G, Jirillo E. Studies on the epidemiology of child infections in the Bari. VII. Epidemiology of Epstein-Barr infections. Eur J epidemiol 1993; 9: 368-72.
- 41- Vardar F. EBV. Güncel pediyatri dergisi 2008; 6: 62-5.
- 42- Kutlu SS, elikbaŒ AK.İnfeksiyon hastalıklarında IgG avidite testinin değeri. İnfeksiyon derk. 2003; 17 (3): 365-368.

- 43- Strasek K, Marin J. EBV infections- Aviditi test for IgG antibodies. *Zidrav Vestin* 2001; 70: 321-3.
- 44- Ory F, Antonaya J, Fernandes MV, Echevaria JM. Application of low-avidity immunoglobulin G studies to diagnosis of EBV infectious mononucleosis. *J Clin Microbiol.* 1993 Jun; 31 (6): 1669-71.
- 45- Hess R. Routine EBV Diagnostics from the laboratory perspective: steel challenging after 35 years. *J Clin (Microbiol)* 2004; 42: 3381-7.
- 46- Farber I, Hinderer W, Rothe M, Lang D, Sonneborn HH, Wutzler P. Sereological diagnosis of EBV infection by novel ELISAs based on recombinant cabsid antigens p23 and p18. *J Med Virol.* 2001; 63(4):271-6
- 47- Tierney RJ, Steven N, Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus laterncy in blood mononuclear cells: Analisis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier satate. *J virol.* 1994; 68 (11): 7374-85.
- 48- Anderson J, Ernberg I. Management of EBV infections *Am J Med* 85:107-14, 1988.
- 49- Crawford DH. Biology and disease association of Epstein-Barr virus review. *Philos trans R soc Lond B Biol Sci.* 2001 29; 356 (1408): 461-73.
- 50- Carbone A, Gloghini A, Dotti G EBV-associated lymphoproliferative disorders: Classification and treatment. *The oncologist*, 2008; 13: 577-85
- 51- Katz BZ. EBV in: principles and practice of pediatric infections disease. Long SS, Pickering LK, Prober CG. Phileadelphia: Churchill Livingstone; 2003; P: 1057-68.
- 52- Burkit D. A sarcoma involve the jaws in African children. *Br J Surg.* 1958; 46 (197): 218-23.
- 53- Yaung LS, Murray PG. EBV and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 2003; 22: 5108-21.
- 54- Kutok JL, Wang F. Spectrum of Epstein-Barr virus- associated disease. *Annu Rev Pathol* 2006; 1: 375-404.
- 55- Bağır E. Çocukluk çağı lenfomalarında EBV insidansının araştırılması (uzmanlık tezi). Adana: Çukurova Üniversitesi; 2009.
- 56- Arman D. Epstein Barr virüs. Wilke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi.* 2. baskı. İstanbul: Nobel Kitap Evi; 2002. 1197-201.
- 57- Rezk SA, Weiss LM. EBV associated lymphoproliferative disorders. *Human pathology.* 2007; 38: 1293-304.

- 58- Meerbac A, Wudsler P, Hafer R et all. Monitoring of EBV load after hematopoietic stem cell transplantation for early intervention in post transplant lymphoproliferative disease. J Med Virol 2008; 80: 441-54.
- 59- Link MP, Weinstein HJ. Malignant Non-hodgkin lymphoma in children. Pizzo PA, Poplack DG, In: Principles and practice of pediatric oncology 5th ed. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2006; pp:695-721
- 60- Englund JA. The many faces of EBV. Postgraduate Med. 83 (2) : 167-80. 1988.
- 61- Epstein MA. Vaccination against EBV: Current progress and future strategies. Lancet Jun 21: 1425-27, 1986.
- 62- Geçgel S. Epstein-Barr virus enfeksiyonlarının tanısında polimeraz zincir reaksiyonunun yeri (Uzmanlık tezi). Bursa: Uludağ Üniversitesi; 2011.
- 63- Gedik M. Değişik yaş gruplarında Epstein-Barr Virus antikorlarının IFA yöntemiyle araştırılması (uzmanlık tezi). Diyarbakır: Dicle Üniversitesi; 2007.
- 64- Feyzioglu B. Epstein-Barr Virus enfeksiyonunun tanısında indirekt immunofloresan ve ELISA tanı metodlarının karşılaştırılması (uzmanlık tezi). Konya: Selçuk Üniversitesi; 2008.
- 65- Altuglu I, Aksoy A, Zeytinoglu A, Orman M. Epstein-Barr virus viral kapsid antikorlarının saptanmasında immunblot yönteminin değerlendirilmesi. Mikrobiol Bul 2010; 44: 231-36.
- 66- Karadag S, Sınırtas M, Göral G. Epstein-Barr Virus antikorlarının Araştırılmasında Kullanılan Paul-Bunnell testi ve İmmunblot yönteminin karşılaştırılması. Türk Mikrobiol Cem Derg (2010) 40(2):117-124.
- 67- Michalek J, Horvath R. High incidence of EBV, cytomegalovirus and human herpesvirus 6 infections in children with cancer. BMC Pediatr 2002; 2:1.
- 68- Rosemary C, Stevenson J, Phansalkar A, Hillyard D, Litwin C, Petti C. Limitations PCR testing for diagnosis acute EBV infections. Diag Microbiol Infect Dis 2007; 58: 333-5.
- 69- Soylu M, Zeytinoglu A, Altuglu I. Ege Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran hastalarda enzim işaretli floresan test ile elde edilen Epstein-Barr virusu serolojik test sonuçlarının değerlendirilmesi. Ege Tıp Dergisi 2014; 53(3): 119-123.
- 70- Wagner HJ, Schlager F, Claviez A, Bucskey P. Detection of EBV DNA in peripheral blood of pediatric patients with hodgkins disease by real time PCR. Eur J Cancer 2001; 37: 1853-7

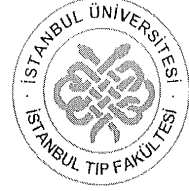
71-Jabs W, Maurmann S, Wagner H, et al. Time course and frequency of EBV reactivation after kidney transplantation: Linkage to renal allograft rejection. *J Infect Dis* 2004; 190 : 1600-4.

72-Chan KCA, Zhang J, Chan ATC, et al. Molecular characterization of circulating EBV DNA in the plasma of nasopharyngeal carcinoma and lymphoma patients. *Cancer Res* 2003; 63: 2028-32.



ETİK KURUL KARARI

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**



Sayı : 1050

Tarih : 06.06.2011

Konu : Prof. Dr. Ali AĞAÇFİDAN hk,

**Sayın Prof. Dr. Ali AĞAÇFİDAN
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi
İlgi : 05.05.2011 tarihli 472 sayılı yazınız**

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yük. Lis. Öğr. Tuğçe YALÇIN'ın yürüteceği 2011/980-585 dosya numaralı "Pediatrik Hematoloji-Onkoloji Kliniği Hastalarında İmmunblot Yöntemi ile Epstein-Barr Virus Serolojisi Araştırılması" başlıklı tez çalışması kurulumuzun 27.05.2011 tarihli 08 sayılı toplantısında etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.
Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

**Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı**

Eki: Tutanak

ÖZGEÇMİŞ

